

ABSTRAK

KARAKTERISASI BEBERAPA *GANODERMA* SP. DI INDONESIA DAN AKTIVITAS INHIBISI DIPEPTIDIL PEPTIDASE-4 SERTA ALFA-GLUKOSIDASE METABOLIT UTAMA *GANODERMA AUSTRALE* (FR.) PAT.

Oleh
Krisyanti Budipramana
NIM: 30716009
(Program Studi Doktor Farmasi)

Penggunaan herbal secara tradisional untuk menyembuhkan penyakit diabetes mellitus sebagai sumber obat telah banyak dilakukan di masyarakat salah satunya jamur Ganoderma. Marga Ganoderma dibagi menjadi dua submarga berdasarkan ada tidaknya palisade. Submarga Ganoderma dengan permukaan mengkilap (*laccate surface*) atau memiliki palisade digolongkan ke dalam *G. lucidum* complex atau *Ganoderma* sedangkan submarga Ganoderma dengan permukaan tidak mengkilap (*non-laccate surface*) masuk ke dalam *G. applanatum* complex atau *Elvingia*.

Diabetes mellitus (DM) merupakan penyakit kompleks bersifat progresif yang disebabkan oleh gangguan pada metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein akibat kurangnya sekresi insulin, sensitivitas reseptor insulin, atau keduanya. Jumlah penderita diabetes mellitus cenderung mengalami kenaikan tiap tahunnya. Sitagliptin, linagliptin, dan alogliptin merupakan beberapa contoh obat golongan inhibitor DPP-4 yang telah beredar. Golongan obat inhibitor DPP-4 bekerja dengan cara memperpanjang waktu paruh dari *glucagon like peptide-1* (GLP-1) yang kurang dari 2 menit akibat metabolisme dari enzim DPP-4. Dengan dihambatnya enzim DPP-4 maka kinerja hormon GLP-1 diharapkan dapat lebih maksimal dalam menyerap glukosa ke dalam sel tubuh. Keuntungan lain dari terapi inhibitor DPP-4 adalah kemampuannya sebagai terapi tunggal maupun kombinasi untuk tidak menginduksi kenaikan berat badan seperti golongan obat anti diabetes mellitus lama.

Golongan obat oral antidiabetes yang juga memiliki resiko minimal terhadap peningkatan berat badan dan hipoglikemia ditunjukkan oleh golongan penghambat enzim α -glukosidase. Golongan obat ini bekerja dengan cara menghambat pemecahan polisakarida menjadi glukosa sehingga tidak terjadi absorpsi lonjakan kadar gula darah pada titik waktu tertentu.

Namun budidaya dan penggunaan medis submarga *Ganoderma applanatum* complex kurang dimanfaatkan dibandingkan dengan submarga Ganoderma. Di samping itu laporan aktivitas Ganoderma masih terbatas pada ekstrak. Berdasarkan

kajian di atas, perlu ditelaah kandungan metabolit sekunder dari submarga *Ganoderma applanatum* complex dan kemampuannya dalam menghambat enzim DPP-4 dan α -glukosidase secara *in vitro* dan *in silico*.

Penelitian ini dimulai dengan mengumpulkan beberapa *Ganoderma applanatum* complex dan *Ganoderma lucidum* complex. Jamur *G. australe* merupakan satu-satunya jenis *Ganoderma applanatum* complex yang berhasil dikumpulkan dan diekstraksi menggunakan pelarut dengan kepolaran bertingkat menggunakan alat Soxhlet. Isolasi dilakukan dengan metode kromatografi kolom hingga diperoleh 3 isolat. Berdasarkan hasil karakterisasi dan identifikasi Resonansi Magnetik Inti (RMI) diketahui ketiga isolat tersebut merupakan turunan steroid yaitu stellasterol, campuran ergosterol peroksida dan 9(11)-dehidroergosterol peroksida, serta ergosterol. Selanjutnya ketiga macam ekstrak dan ketiga isolat diuji aktivitasnya dalam menghambat enzim DPP-4 dan α -glukosidase.

Aktivitas penghambatan enzim DPP-4 oleh ekstrak metanol (IC_{50} $12,63 \pm 5,17$) $\mu\text{g/ml}$ paling baik dibandingkan ekstrak lainnya. Sebaliknya, ekstrak metanol (IC_{50} $86,59 \pm 13,42$) $\mu\text{g/ml}$ memberikan aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase paling rendah dibandingkan ekstrak lain. Ergosterol peroksida memberikan aktivitas penghambatan paling tinggi dalam menghambat enzim DPP-4 (IC_{50} $138,96 \pm 24,76$) μM dan α -glukosidase (IC_{50} $50,09 \pm 16,47$) μM dibandingkan isolat lainnya.

Studi *in silico* digunakan sebagai pendekatan untuk menggambarkan pola interaksi dari ketiga isolat dengan sisi aktif enzim DPP-4 (PDB: 1X70) dan α -glukosidase (PDB: 3W37). Stellasterol, ergosterol peroksida, dan ergosterol tidak membentuk ikatan hidrogen dengan asam amino yang sama dengan sitagliptin sebagai kontrol positif di dalam kantung enzim DPP-4. Sebaliknya, ketiga isolat banyak membentuk ikatan π -alkil dengan asam amino pada kantung S1 yang bersifat hidrofobik. Ketiga isolat hanya mengikat tiga asam amino yang sama bila dibandingkan dengan sitagliptin, yaitu Tyr666, Tyr662, dan Phe357. Pengujian ketiga isolat pada kantung enzim α -glukosidase menunjukkan bahwa ketiga isolat berikatan dengan enam asam amino yang sama bila dibandingkan dengan akarbosa, yaitu His626, Asn237, Ala234, Trp329, Phe601, dan Met470.

Dapat disimpulkan bahwa mekanisme kerja ketiga isolat turunan steroid sebagai anti diabetes mellitus tipe 2 diperkirakan lebih menyerupai inhibitor α -glukosidase daripada sebagai inhibitor DPP-4.

Kata kunci: α -glukosidase, DPP-4, ergosterol, *Ganoderma*, stellasterol, *in silico*.

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF SEVERAL GANODERMA SP. IN INDONESIA AND DIPEPTIDYL PEPTIDASE-4 ALSO ALPHA-GLUCOSIDASE INHIBITORY ACTIVITIES FROM THE MAIN METABOLITES OF GANODERMA AUSTRALE (FR.) PAT.

By

Krisyanti Budipramana

NIM: 30716009

(Doctoral Program in Pharmacy)

The utility of herbal medicine to cure diabetes mellitus have been practiced by people, one of them is Ganoderma mushroom. Ganoderma genus is divided into two subgenus according to the presence of palisade. Ganoderma subgenus with shiny surface (laccate surface) or has palisade was categorized into G. lucidum complex or Ganoderma while Ganoderma subgenus without shiny surface (non-laccate surface) or absent palisade was categorized into G. applanatum complex or Elfvigia.

Diabetes mellitus is a complex progressive disease induced by an abnormal fat, carbohydrate, and protein resulting from defects in low insulin secretion, insulin sensitivity, and/or both. The number of diabetes mellitus incidence tend to increase every year. Sitagliptin, linagliptin, and alogliptin are some types of inhibitor DPP-4 that have been released. Inhibitor DPP-4 works to prolong the half-life of glucagon like peptide-1 (GLP-1) which less than 2 minutes due to DPP-4 enzyme metabolism. By inhibiting DPP-4 enzyme, the GLP-1 hormone can works maximally to absorp glucose from polyssaccharide breakdown contained in food ingestion into the cell. Another advantages of inhibitor DPP-4 is their ability as mono or combination therapy to stabilize the weight gain due to DPP-4 inhibitors are associated with slow down of gastric emptying. This phenomena is rare in old diabetes mellitus therapy.

Another class of oral anti diabetic that also has minimal risk to stabilize the weight gain is shown by α -glucosidase inhibitor. This inhibitor works by preventing the degradation of polysaccharides into glucose thus the rise of post prandial glucose can be avoided.

The cultivate and utility of G. applanatum complex for medical are less compared to G. lucidum complex. As mentioned before, there are necessity to study the secondary metabolite of G. applanatum complex and their ability to inhibit DPP-4 enzyme and α -glucosidase both in in vitro and in silico study.

This study began by collecting some Ganoderma applanatum complex and Ganoderma lucidum complex. G. australe was the only member of Ganoderma applanatum complex that has been collected. Subsequently, G. australe was extracted with n-hexane, ethyl acetate, and methanol using Soxhlet. Isolation process was performed on column chromatography to isolate three compounds. According to characterization and identification by Nuclear Magnetic Resonance those compounds were stellerol, ergosterol peroxide, and ergosterol. The three isolates were then assayed for their capacity to inhibit DPP-4 enzyme and α -glucosidase.

Methanol extract (IC_{50} 12.63 \pm 5.17 μ g/ml) showed the highest activity as DPP-4 inhibitor compared to other extracts. On the contrary, methanol extract (IC_{50} 86.59 \pm 13.42 μ g/ml) showed the lowest activity to inhibit α -glucosidase enzyme among the extracts. Ergosterol peroxide showed the highest activity either to inhibit DPP-4 (IC_{50} 138,96 \pm 24,76 μ M) or α -glucosidase enzyme (IC_{50} 50,09 \pm 16,47 μ M).

In silico study was conducted to figure out the binding pattern of protein-ligand pose between three isolates and the cavity of DPP-4 enzyme (PDB: 1X70) also α -glucosidase (PDB: 3W37). Stellerol, ergosterol peroxide, and ergosterol form hydrophobic interaction (π -alkyl) in S1 pocket in DPP-4 cavity compared to sitagliptin as positive control. Those isolates bound three amino acid Tyr666, Tyr662, and Phe357 similar to the interaction between the enzyme and sitagliptin. The docking of three isolates into α -glucosidase cavity revealed that those isolates bound more amino acids compared to DPP-4 cavity which are His626, Asn237, Ala234, Trp329, Phe601, and Met470.

Mechanism of three isolates as steroid derivate as anti diabetes mellitus was more likely as an α -glucosidase inhibitor rather than as DPP-4 inhibitor

Keywords: α -glucosidase, DPP-4, ergosterol, Ganoderma, stellerol, in silico.